



Flaveria属における遺伝子発現制御系の確立

著者	岡 美慧
発行年	2017
URL	http://hdl.handle.net/10236/00027069

Flaveria 属における遺伝子発現制御系の確立

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 宗景研究室 岡 美慧

【研究目的】 *Flaveria* 属植物は同属内に複数の C₃ 種および C₄ 種が存在し、それらのゲノム背景が近いことから、進化過程の解析が可能な植物である。本研究では、*Flaveria* 属 C₃ 種における形質転換系および C₄ 種における遺伝子発現誘導系の確立を目的として研究を行う。遺伝子発現誘導系は、誘導因子を与えた時のみ一過的に遺伝子発現を起こすことができるため遺伝子の機能解析に有用である。アルコール誘導系はエタノールの結合により活性を持った ALCR が *alcA* プロモーターに結合することで *alcA* プロモーターからの転写が誘導される。GVG 転写誘導系は、GAL4 の DNA 結合ドメイン、VP16 の転写活性化ドメイン、ラットのグルココルチコイドホルモン結合ドメインにより構成される GVG にグルココルチコイドホルモンが結合することで活性を持つ。活性を持った GVG が *GAL4-DNA* 結合配列に結合することでこの結合配列を有するプロモーターからの転写が誘導される。本研究ではこれらの遺伝子発現誘導系が C₄ 種 *Flaveria bidentis* において有用であるか検証する。また、C₃ 種 *Flaveria pringlei* の形質転換系を確立するために組織培養条件の最適化を行う。

【実験方法】 (1)C₄ 種 *F. bidentis* における遺伝子発現誘導系の確立 GVG 転写誘導系に *EYFP* をレポーターとして組み込んだコンストラクトを *F. bidentis* に導入し GVG 転写誘導系植物を取得した。グルココルチコイドの一種であるデキサメタゾン(DEX)溶液を葉に浸潤させることで *EYFP* タンパク質の発現が誘導されるかどうかを解析した。また、*GFP* をレポーターとして組み込んだアルコール誘導系植物と GVG 転写誘導系植物において、根端部を葉剤に浸潤させる方法でどちらでよりレポーター遺伝子の *mRNA* およびタンパクの蓄積が見られるか調べた。(2)C₃ 種 *F. pringlei* における形質転換系の確立 カルス・シュート誘導培地(CSRM)におけるオーキシシンとサイトカイニンの濃度比を検討した培地を作製し、*F. pringlei* の組織片からカルス・シュートの形成が最も誘導される培地を決定した。最適化した CSRМ を用いて *GUS* 遺伝子の導入を行い、得られた形質転換体に遺伝子が導入されているか確認した。

【結果と考察】 (1)C₄ 種 *F. bidentis* における遺伝子発現誘導系の確立 卒業研究で、アルコール誘導系を導入した *F. bidentis* において非誘導時の葉から既に遺伝子の発現が起こることを確認した。GVG 転写誘導系植物において、DEX 誘導により *EYFP* タンパク質の蓄積が見られた系統が得られた。アルコール誘導系植物と、GVG 転写誘導系植物において根端部を誘導葉剤に 5 時間浸潤させ、レポーター遺伝子の発現が誘導されるか調べた。GVG 転写誘導系では誘導後のサンプルから顕著な *EYFPmRNA* の蓄積が見られたが、アルコール誘導系植物では誘導後のサンプルで *GFPmRNA* の蓄積が見られなかった。よって 5 時間の葉剤処理では GVG 転写誘導系の方がアルコール誘導系よりも誘導能が高いとわかった。(2)C₃ 種 *F. pringlei* における形質転換系の確立 サイトカイニンであるベンジルアデニンを 2.0 mg/L のみ添加した CSRМ が最もカルス・シュート形成率が誘導されることがわかった。最適化した CSRМ を用いて *F. pringlei* の形質転換を行った。*GUS* 遺伝子が導入された形質転換体を取得したが全ての個体で *GUS* 活性が検出されなかった。しかしそれらの個体の中には *GUSmRNA* の蓄積が見られた個体があった。*F. pringlei* では導入遺伝子のサイレンシングや翻訳抑制が起きやすい可能性が示唆された。